



IRJ

In re Application of:

Ludwig ZORN et al.

Examiner: HANLEY, Susan M.

Serial No.: 10/625,559

Group Art Unit: 1651

Filed: JULY 24, 2003

Title: **MICROBIOLOGICAL PROCESS FOR THE PRODUCTION OF 7-SUBSTITUTED 11-HYDROXY STEROIDS, 7,17-SUBSTITUTED 11-HALOGEN STEROIDS THAT CAN BE PRODUCED THEREFROM, THEIR PROCESS FOR PRODUCTION AND USE AS WELL AS PHARMACEUTICAL PREPARATIONS THAT CONTAIN THESE COMPOUNDS**

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

MAIL STOP ISSUE FEE

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

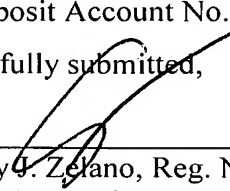
Submitted herewith is a certified copy of each of the below-identified document(s), benefit of priority of each of which is claimed under 35 U.S.C. § 119:

COUNTRY	APPLICATION NO.	FILING DATE
GERMANY	102 33 723.3	July 24, 2002

Acknowledgment of the receipt of the above document(s) is requested.

No fee is believed to be due in association with this filing, however, the Commissioner is hereby authorized to charge fees under 37 C.F.R. §§ 1.16 and 1.17 which may be required to facilitate this filing, or credit any overpayment to Deposit Account No. 13-3402.

Respectfully submitted,



Anthony J. Zelano, Reg. No. 27,969
Attorney/Agent for Applicant(s)

MILLEN, WHITE, ZELANO
& BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1, Suite 1400
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, Virginia 22201
Telephone: (703) 243-6333
Facsimile: (703) 243-6410
Attorney Docket No.: **SCH-1915**
Date: April 26, 2007

52299



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 33 723.3

Anmeldetag: 24. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin/DE

Bezeichnung: Mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von 7a-substituierten 11a-Hydroxysteroiden, daraus herstellbare 7a,17a-substituierte 11 β -Halogensteroiden, deren Herstellungsverfahren und Verwendung sowie pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen enthalten, sowie daraus herstellbare 7a-substituierte Estra-1,3,5(10)-triene

IPC: C 07 J, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Sl e



- Mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden, daraus herstellbare 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroiden, deren Herstellungsverfahren und Verwendung sowie pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen enthalten, sowie daraus herstellbare 7 α -substituierte Estra-1,3,5(10)-triene**

Beschreibung:

- Die Erfindung betrifft mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden, daraus herstellbare 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroiden, Herstellungsverfahren für letztere Verbindungen sowie deren Verwendung und pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen enthalten. Außerdem betrifft die Erfindung weitere 7 α -substituierte 11 β -Halogensteroiden, nämlich 7 α -substituierte Estra-1,3,5(10)-triene, die aus den 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden erhältlich sind.

- Zur Therapie des Klimakterium virile und zur Entwicklung der männlichen Sexualorgane sowie zur männlichen Fertilitätskontrolle werden Androgene, insbesondere Testosteron, eingesetzt. Außerdem besitzen diese Hormone auch partielle anabole Wirkkomponenten, die unter anderem das Muskelwachstum fördern.

- Das Klimakterium virile ist durch einen altersbedingten Rückgang der körpereigenen Androgenproduktion gekennzeichnet, so daß zu deren Behandlung ein Hormonersatz durchgeführt wird (HRT: hormone replacement therapy).

- Die LH-RH-Gabe zur männlichen Fertilitätskontrolle führt neben einer Verminderung der Spermatogenese auch zur Ausschüttung von LH und zur Absenkung von Testosteronspiegeln und Libido, die durch Verabreichung von Testosteron-Arzneimitteln ausgeglichen werden (D.E.Cummings et al., "Prostate-Sparing Effects of the Potent Androgen 7 α -Methyl-19-Nortestosterone: A Potential Alternative to Testosterone for Androgene Replacement and Male Contraception", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 83, Nr. 12, Seiten 4212-4219 (1998)).

Eine Kombinationstherapie unter Gabe von Androgenen und einer gestagen wirksamen Komponente kann zur Kontrolle der männlichen Fertilität angewendet werden (siehe beispielsweise WO 01/60376 A sowie die darin zitierten Dokumente).

Bei einer Behandlung mit Testosteron hat sich gezeigt, daß sich Nebenwirkungen einstellen, insbesondere eine Vergrößerung der Prostata durch numerische Zunahme der Zellen und Drüsen des Stromas (BPH: benigne Prostatahyperplasie). Bei dem durch 5 α -Reduktase vermittelten Metabolismus von Testosteron entsteht Dihydrotestosteron (DHT), das unter anderem zum Auftreten der BPH führen kann (Cummings et al., *ibid.*; WO 99/13883 A1). Die Inhibition der 5 α -Reduktase wird daher zur Behandlung der BPH in der Klinik eingesetzt (Finasteride).

Der schnelle Metabolismus des androgenen Steroids Testosteron im Körper des Menschen führt ferner nicht nur zur Bildung des unerwünschten DHT, sondern auch dazu, daß eine orale Gabe hoher Dosen erforderlich ist, um den gewünschten Wirkspiegel von Testosteron zu erreichen. Daher sind alternative Darreichungsformen, wie *i.m.*-Injektionen oder große Pflaster, nötig.

Zum Ersatz des Testosterons in den erwähnten Indikationsbereichen wurde 7 α -Methyl-19-nortestosteron (MeNT) vorgeschlagen, das zum einen eine höhere biologische Wirksamkeit als Testosteron aufweist, da es eine höhere Bindungsaffinität zu den Androgenrezeptoren hat. Zum anderen widersteht es wegen einer sterischen Hinderung durch die 7 α -Methylgruppe vermutlich der Metabolisierung durch 5 α -Reduktase (Cummings et al., *ibid.*, WO 99/13883 A1, WO 99/13812 A1, US-A-5,342,834).

Beim Metabolismus von Testosteron wird ferner ein geringer Teil dieser Verbindung durch Aromatisierung des Ringes A des Steroidsystems zu Estradiol umgesetzt, insbesondere im Gehirn, in der Leber und im Fettgewebe. Estradiol ist hinsichtlich der Gesamtwirkung des Testosterons und dessen Metaboliten maßgeblich für das geschlechtsspezifische Verhalten und die Gonadotropin-

Regulation verantwortlich. Daher ist dessen Wirkung ebenso wie die des Testosterons für den erwachsenen Mann als günstig anzusehen (Cummings et al., *ibid.*).

- 5 Allerdings hat sich herausgestellt, daß die Pharmakokinetik von Testosteron nicht befriedigend ist. Insbesondere wird Testosteron bei oraler Darreichung schnell wieder ausgeschieden, so daß die Wirksamkeit und Wirkdauer von damit hergestellten Arzneimitteln unbefriedigend ist. Daher wurden auch andere Testosteron-Derivate synthetisiert. Derartige Derivate sind unter anderem in
- 10 US-A-5,952,319 beschrieben, insbesondere 7α -, 11β -Dimethylderivate von 19-Nortestosteron, nämlich 7α , 11β -Dimethyl- 17β -hydroxyestr-4-en-3-on, 7α , 11β -Dimethyl- 17β -heptanoyloxyestr-4-en-3-on, 7α , 11β -Dimethyl- 17β -[[$(2$ -cyclopentylethyl)-carbonyl]-oxy]-estr-4-en-3-on, 7α , 11β -Dimethyl- 17β -(phenylacetyloxy)-estr-4-en-3-on und 7α , 11β -Dimethyl- 17β -[[$(trans$ -4-[n -butyl]cyclohexyl)-carbonyl]-oxy]-estr-4-en-3-on.
- 15

Die genannten 7α , 11β -Dimethylderivate weisen wie MeNT die vorgenannten Vorteile auf, einschließlich einer verbesserten Pharmakokinetik, d.h. deren Wirksamkeit und Wirkdauer sind gegenüber Testosteron verbessert. Diese Derivate sind allerdings nur über einen aufwendigen Syntheseweg herstellbar.

20

Eine Synthese von Steroiden auf mikrobiologischem Wege ist in EP 0 900 283 B1 beschrieben. Dort wird angegeben, daß Estr-4-en-3,17-dion und Canrenon unter Verwendung eines Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus nigricans*, *Rhizopus arrhizus* und Stämmen des *Pestalotia*, in

25 das korrespondierende 11α -Hydroxyanalogon transformiert werden können. Allerdings wird in der Beschreibungseinleitung auch auf Shibahara et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 202 (1970), 172-179 hingewiesen, die berichtet haben, dass die mikrobiologische 11α -Hydroxylierungsreaktion an Steroiden unvorhersagbar sei.

30

A Von daher liegt der vorliegenden Erfindung das Problem zugrunde, Derivate des Testosterons zu finden, die gegenüber einer Reduktion mittels 5α -Reduktase nicht empfindlich sind, die auch eine verbesserte Pharmakokinetik aufwei-

sen und die insbesondere leicht herstellbar sind. Ein sehr wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht demgemäß darin, zur besseren Zugänglichkeit der Vorprodukte ein Verfahren zu finden, mit dem die Vorprodukte leicht herstellbar sind.

5

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Problem wird gelöst durch mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von 7α -substituierten Steroiden nach den Ansprüchen 1, 3 und 6, $7\alpha,17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroiden nach Anspruch 11, Verfahren zur Herstellung $7\alpha,17\alpha$ -substituierter 11β -Halogensteroiden nach den Ansprüchen 23, 24 und 25, die Verwendung dieser $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden nach Anspruch 26, pharmazeutische Präparate, die diese $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden enthalten, nach Anspruch 27 sowie 7α -substituierte 11β -Halogenestra-1,3,5(10)-triene nach Anspruch 21. Bevorzugte Ausführungsformen der beanspruchten Gegenstände sind in den Unteransprüchen angegeben.

Definitionen:

20 Die nachfolgenden Definitionen beziehen sich auf alle Teile der Beschreibung und der Ansprüche sowie auf das anliegende Schema I:

Alle Gruppierungen, Reste oder sonstigen strukturellen Einheiten können jeweils unabhängig voneinander innerhalb der angegebenen Bedeutungsbereiche variiert werden.

Alle Alkyl-, Alkylen-, Alkenyl-, Alkenylen-, Alkynyl-, Alkinylen-Gruppen können entweder geradkettig oder verzweigt sein. Beispielsweise kann eine Propenylgruppe durch eine der nachfolgenden chemischen Strukturen: $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ beschrieben werden. Somit fallen unter C_1 - bis C_{16} -Alkyl beispielsweise Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, *i*-Propyl, *n*-Butyl, *i*-Butyl, *t*-Butyl, *n*-Pentyl, *i*-Pentyl, *t*-Pentyl, *neo*-Pentyl, *n*-Hexyl, 1-Methyl-*n*-pentyl, 2-Methyl-*n*-pentyl, 3-Methyl-*n*-pentyl, 4-Methyl-*n*-pentyl, 1-Ethyl-*n*-butyl, 2-Ethyl-*n*-butyl usw.

Alicyclisches Alkyl ist entweder ein Cycloalkyl oder ein mit einer Alkylgruppe oder mehreren Alkylgruppen substituiertes Cycloalkyl, das direkt über den Cycloalkylring oder über eine der Alkylgruppen gebunden ist.

5

In gleicher Weise ist ein alicyclisches Alkenyl entweder ein Cycloalkenyl oder ein mit einer oder mehreren Alkenylgruppen oder mit einer oder mehreren Alkenyl- und Alkylgruppen oder mit einer oder mehreren Alkylgruppen substituiertes Cycloalkenyl oder Cycloalkyl, das direkt über den Cycloalkenylring oder
10 über eine der Alkenyl- oder gegebenenfalls Alkylgruppen gebunden ist, wobei mindestens eine Doppelbindung in dem alicyclischen Alkenyl enthalten ist.

Aryl kann zum einen Phenyl aber auch 1-Naphthyl, 2-Naphthyl sein. Aryl schließt grundsätzlich auch Heteroaryl mit ein, insbesondere 2-, 3- und 4-Pyridinyl, 2- und 3- Furyl-, 2- und 3-Thienyl, 2- und 3-Pyrrolyl, 2-, 4- und 5-Imidazolyl, Pyridazinyl, 2-, 4- und 5-Pyrimidinyl sowie 3- und 4-Pyridazinyl.
15

Halogen ist Fluor, Chlor, Brom oder Iod.

20 Pharmazeutisch verträgliche Additionssalze sind Salze der entsprechenden Verbindungen mit anorganischen oder organischen Säuren, beispielsweise mit Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Essigsäure, Citronensäure, Oxalsäure, Weinsäure und Methansulfonsäure. Die Ester können insbesondere mit Bernsteinsäure gebildet werden.

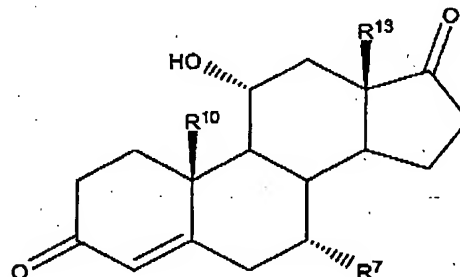
25

Hochgestellte Ziffern an den Symbolen R, beispielsweise R¹³, bezeichnen deren Stellung am Steroidringgerüst, wobei die C-Atome im Steroidringgerüst nach IUPAC-Nomenklatur numeriert sind. Hochgestellte Ziffern an den Symbolen C, beispielsweise C¹⁰, bezeichnen die Stellung des jeweiligen Kohlenstoffatoms im Steroidringgerüst.
30

6

Erfindungsbeschreibung:

Die neuartigen mikrobiologischen Verfahren dienen zur Herstellung der 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel **4,B**:

**4,B**

5

worin

R⁷ die Gruppierung P-Q ist, wobei

P ein C₁- bis C₄-Alkyl- und Q ein C₁- bis C₄-Alkyl- oder C₁- bis C₄-Fluoralkyl (Alkyl teilweise oder vollständig fluoriert) darstellen

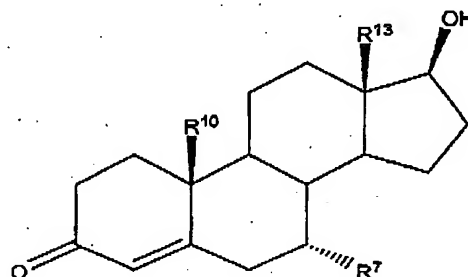
10

und die Gruppierung P-Q über P an das Steroidgrundgerüst gebunden ist,

R¹⁰ für H, CH₃ oder CF₃ steht, und

R¹³ Methyl oder Ethyl ist.

- 15 In einer ersten Verfahrensvariante zur Herstellung dieser Substanzen wird ein geeignetes 7 α -substituiertes Steroid mit der allgemeinen Formel **3,A**:

**3,A**

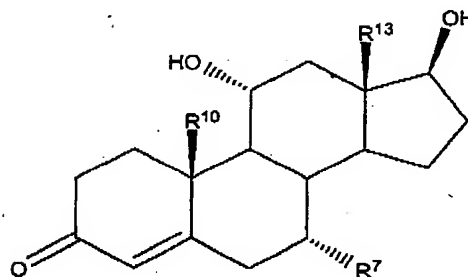
worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie für die Verbindungen mit der allgemeinen Formel **4,B** angegeben,

- unter Verwendung eines Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Glomerella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Haplosporella sp.* und *Rhizopus sp.*, in einem Verfahrensschritt hydroxyliert und oxidiert. Besonders bevorzugt sind *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus malignus*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Glomerella cingulata*, *Gnomonia cingulata*, *Haplosporella hesperedica* und *Rhizopus stolonifer*, wobei insbesondere *Aspergillus awamori* (CBS), *Aspergillus fischeri* (ATCC 1020), *Aspergillus malignus* (IMI 16061), *Aspergillus niger* (ATCC 9142), *Beauveria bassiana* (ATCC 7159), *Glomerella cingulata* (CBS 15226, CBS 23849, CBS 98069, ATCC 56596, ATCC 64682, IFO 6425), *Gnomonia cingulata* (CBS 15226), *Haplosporella hesperedica* (CBS 20837) und *Rhizopus stolonifer* (ATCC 15441) eingesetzt werden.

- Alternativ kann dieses mikrobiologische Herstellverfahren auch in zwei Stufen durchgeführt werden, wobei die Hydroxylierungs- und die Oxidationsreaktion in aufeinander folgenden Reaktionsschritten ablaufen. Der Reaktionsablauf kann über die Reaktionsdauer gesteuert werden: Indem die Reaktion beispielsweise nach einer bestimmten Reaktionszeit unterbrochen wird, kann die hydroxylierte, aber noch nicht oxidierte Spezies isoliert werden. Beide Verfahrensschritte können daher separat oder in einer Mischfermentation durchgeführt werden:

- Hierzu kann die Verbindung mit der allgemeinen Formel **3,A** in einem ersten mikrobiologischen Verfahrensschritt unter Verwendung eines ersten Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Gibberella sp.*, *Glomerella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Metarrhizium sp.*, *Nigrospora sp.*, *Rhizopus sp.* und *Verticillium sp.*, in 11-Stellung hydroxyliert werden, wobei sich ein 7α -substituiertes Steroid mit einer Hydroxygruppe in 11α -Stellung bildet. Diese Verbindung hat die allgemeine Formel **C**:

8



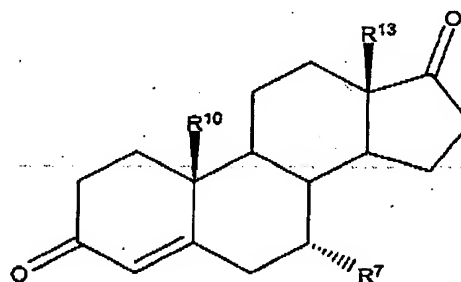
C

worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie zuvor für die Verbindungen mit der allgemeinen Formel 4,B angegeben. Besonders werden *Aspergillus* 5 *malignus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Beauveria bassiana*, *Gibberella fujikuroi*, *Gibberella zeae*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella fusaroides*, *Gnomonia cingulata*, *Metarrhizium anisopliae*, *Nigrospora sphaerica*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* und *Verticillium dahliae* eingesetzt. Hierbei werden insbesondere *Aspergillus malignus* (IMI 16061), *Aspergillus melleus* (CBS), *Aspergillus niger* (ATCC 11394), *Aspergillus ochraceus* 10 (NRRL 405, CBS 13252, ATCC 46504), *Beauveria bassiana* (ATCC 7159, IFO 5838, ATCC 13144, IFO 4848, CBS 11025, CBS 12736), *Gibberella fujikuroi* (ATCC 14842), *Gibberella zeae* (CBS 4474), *Glomerella cingulata* (ATCC 10534, CBS 23849, CBS 23749, ATCC 16646, ATCC 16052, IFO 6459, IFO 6425, IFO 6470, CBS 98069, IFO 7478, IFO 5257, ATCC 64682, ATCC 15470), 15 *Glomerella fusaroides* (ATCC 9552), *Gnomonia cingulata* (CBS 15226), *Metarrhizium anisopliae* (IFO 5940), *Nigrospora sphaerica* (ATCC 12772), *Rhizopus oryzae* (ATCC 4858, ATCC 34102, ATCC 34102), *Rhizopus stolonifer* (ATCC 6227b, ATCC 15441) und *Verticillium dahliae* (ATCC 11405) für die 20 Hydroxylierung eingesetzt.

Das Zwischenprodukt C wird danach in einem zweiten mikrobiologischen Verfahrensschritt unter Verwendung eines zweiten Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp. und 25 *Pseudomonas* sp., unter Bildung der 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel 4,B oxidiert. Besonders werden *Bacillus lactimorbus*,

Bacillus sphaericus, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium smegmatis*,
Nocardia corallina, *Nocardia globnerula*, *Nocardia minima*, *Nocardia restrictus*,
Nocardia rubropertincta, *Nocardia salmonicolor* und *Pseudomonas testosteronei*
verwendet, wobei insbesondere *Bacillus lactimorbus* (ATCC 245), *Bacillus*
5 *sphaericus* (ATCC 7055), *Mycobacterium neoaurum* (ATCC 9626, NRRL B-
3683, NRRL B-3805), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468), *Nocardia co-*
rallina (ATCC 31338) *Nocardia globnerula* (ATCC 9356), *Nocardia minima*
(ATCC 19150), *Nocardia restrictus* (NCIB 10027), *Nocardia rubropertincta*
(ATCC 14352), *Nocardia salmonicolor* (ATCC 19149) und *Pseudomonas*
10 *testosteronei* (ATCC 11996) eingesetzt werden.

In einer weiteren Verfahrensvariante können die Verbindungen mit der allge-
meinen Formel **4,B** in einer mikrobiologischen Reaktion aus 7α -substituierten
Steroiden mit der allgemeinen Formel **D**:

**D**

15

worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie zu den Verbindungen
mit der allgemeinen Formel **4,B** angegeben, hergestellt werden. Diese Reaktion
wird unter Verwendung eines Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe,
umfassend, *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Curvularia sp.*, *Gibberella sp.*, *Glo-*
10 *merella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Haplosporella sp.*, *Helicostylum sp.*, *Nigrospora sp.*,
Rhizopus sp. und *Syncephalastrum sp.*, durchgeführt, wobei das Steroid-
grundgerüst in 11α -Stellung hydroxyliert wird und somit das 7α -substituierte
 11α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** entsteht. Bevorzugt werden
Aspergillus alliaceus, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus ma-*
25 *lignus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus*
ochraceus, *Aspergillus varicolor*, *Beauveria bassiana*, *Curvularia lunata*, *Gib-*

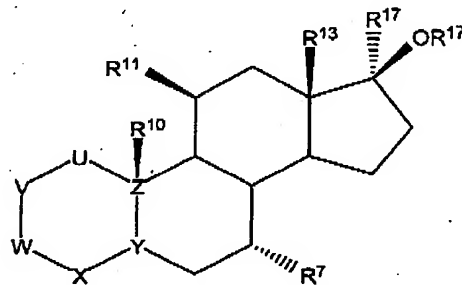
- berella zeae*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella fusaroides*, *Gnomonia cingulata*, *Haplosporella hesperedica*, *Helicostylum piriformae*, *Nigrospora sphaerica*, *Rhizopus oryzae* und *Syncephalastrum racemosum*, wobei insbesondere *Aspergillus alliaceus* (ATCC 10060), *Aspergillus awamori* (CBS), *Aspergillus fischeri* (ATCC 1020), *Aspergillus malignus* (IMI 16061), *Aspergillus melleus* (CBS), *Aspergillus nidulans* (ATCC 11267), *Aspergillus niger* (ATCC 9142, ATCC 11394), *Aspergillus ochraceus* (NRRL 405, ATCC 13252, ATCC 46504), *Aspergillus variegatus* (ATCC 10067), *Beauveria bassiana* (IFO 5838, ATCC 13144, IFO 4848, CBS 11025, CBS 12736, ATCC 7159), *Curvularia lunata* (IX3), *Gibberella zeae* (CBS 4474), *Glomerella cingulata* (ATCC 10534, CBS 23849, CBS 23749, ATCC 16646, IFO 6459, IFO 6425, IFO 6470, ATCC 15093, ATCC 10529, IFO 5257, ATCC 56596, ATCC 64682), *Glomerella fusaroides* (ATCC 9552), *Gnomonia cingulata* (CBS 15226), *Haplosporella hesperedica* (CBS 20837), *Helicostylum piriformae* (ATCC 8992), *Nigrospora sphaerica* (ATCC 12772), *Rhizopus oryzae* (ATCC 4858) und *Syncephalastrum racemosum* (IFO 4827) eingesetzt werden.

- Besonders geeignet sind Verfahren, bei denen 7 α -substituierte 11 α -Hydroxysteroidoide mit der allgemeinen Formel **4,B** hergestellt werden, in denen unabhängig voneinander R⁷ für CH₃ steht und/oder R¹⁰ für H steht und/oder R¹³ für CH₃ steht.

- Das Verfahren wird in üblicher Weise durchgeführt. Hierzu wird typischerweise zunächst eine sterilisierte Nährlösung für den Stamm hergestellt und diese Nährlösung dann mit der Kulturlösung des Stammes beimpft, um den Stamm anzuzüchten. Die auf diese Weise hergestellte Vorkultur wird dann auf einen Fermenter gegeben, der ebenfalls mit einer geeigneten Nährlösung beschickt ist. Vorzugsweise nach einer Anwuchsphase für die Kultur des Stammes wird dann die Ausgangssubstanz zum Fermenter zugegeben, im vorliegenden Falle also entweder eine Verbindung mit der allgemeinen Formel **3,A** oder eine Verbindung mit der allgemeinen Formel **D**, so daß die erfindungsgemäße Reaktion ablaufen kann. Nach Abschluß der Reaktion wird das Stoffgemisch in her-

kömmlicher Weise aufgereinigt, um das gewünschte 7 α -substituierte 11 α -Hydroxysteroid zu isolieren.

- 5 Aus den so erhaltenen Verbindungen mit der allgemeinen Formel **4,B** können weitere erfindungsgemäße Verbindungen mit ebenfalls erfindungsgemäßen Herstellverfahren synthetisiert werden. Insbesondere stellen die 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **8,10,12**:



8,10,12

10

worin

- U-V-W-X-Y-Z für eine der Ringstrukturen C¹-C²-C³-C⁴=C⁵-C¹⁰,
C¹-C²-C³-C⁴-C⁵=C¹⁰ oder C¹-C²-C³-C⁴-C⁵-C¹⁰ steht, wobei in diesem Fall
eine Oxogruppe (=O) an W (=C³) gebunden ist, oder für die Ringstruktur
15 C¹=C²-C³=C⁴-C⁵=C⁶, wobei in diesem Falle der Rest OR³ an W (=C³)
gebunden ist,

R³ für H, C₁- bis C₄-Alkyl, C₁- bis C₄-Alkanoyl oder einen cyclischen C₃-
bis C₇-Ether mit dem O-Atom des OR³-Rests steht,

R⁷ die Gruppierung P-Q ist, wobei

- 20 P ein C₁- bis C₄-Alkyl und Q ein C₁- bis C₄-Alkyl- oder C₁- bis
C₄-Fluoralkyl (Alkyl teilweise oder vollständig fluoriert) darstellt und
die Gruppierung P-Q über P an das Steroidgrundgerüst gebunden
ist,

- 25 R¹⁰ α - oder β -ständig sein kann und für H, CH₃ oder CF₃ steht und nur
dann vorhanden ist, wenn X-Y-Z nicht C⁴-C⁵=C¹⁰ ist,

R¹¹ ein Halogen ist,

R^{13} Methyl oder Ethyl ist,

R^{17} für H, C_1 - bis C_{18} -Alkyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkyl, C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, C_1 - bis C_{18} -Alkynyl, C_1 - bis C_{18} -Alkylaryl, C_1 - bis C_8 -Alkylennitril oder für die Gruppierung P-Q steht, wobei die Gruppierung P-Q die vorgenannte Bedeutung hat,

$R^{17'}$ für H, C_1 - bis C_{18} -Alkyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkyl, C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, C_1 - bis C_{18} -Alkynyl oder C_1 - bis C_{18} -Alkylaryl steht, wobei $R^{17'}$ auch über eine Ketogruppe an die 17β -Oxygruppe gebunden sein kann, und wobei $R^{17'}$ auch zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen $NR^{18}R^{19}$ oder einer oder mehreren Gruppen SO_xR^{20} substituiert sein kann, wobei $x = 0, 1$ oder 2 und R^{18} , R^{19} und R^{20} jeweils unabhängig voneinander dieselbe Bedeutung wie R^{17} haben können.

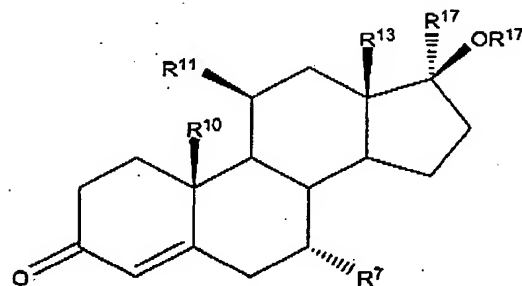
15 sowie deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze, Ester und Amide vorteilhafte Wirkstoffe dar. Diese durch weitere Verfahrensschritte aus dem 7α -substituierten 11α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** erhältlichen Verbindungen sind wertvolle Wirkstoffe mit stark androgener Wirkung ohne die erwähnten Nebenwirkungen. Diese Verbindungen eignen sich zur Herstellung
20 von Arzneimitteln und insbesondere von wirksamen Kontrazeptiva und von Wirkstoffen zur Hormonersatztherapie (HRT).

Falls $R^{17'}$ mit einer Gruppe $NR^{18}R^{19}$ zusätzlich substituiert ist, kann es sich hierbei um eine Methylamino-, Dimethylamino-, Ethylamino-, Diethylamino-, Cyclohexylamino-, Dicyclohexylamino-, Phenylamino-, Diphenylamino-, Benzylamino-
25 oder Dibenzylaminogruppe handeln.

Besonders geeignete $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidoide mit der allgemeinen Formel **8,10,12** sind Verbindungen, bei denen U-V-W-X-Y-Z für die
30 Ringstruktur $C^1-C^2-C^3-C^4=C^5-C^{10}$, $C^1-C^2-C^3-C^4-C^5=C^{10}$ oder $C^1=C^2-C^3=C^4-C^5=C^{10}$ steht.

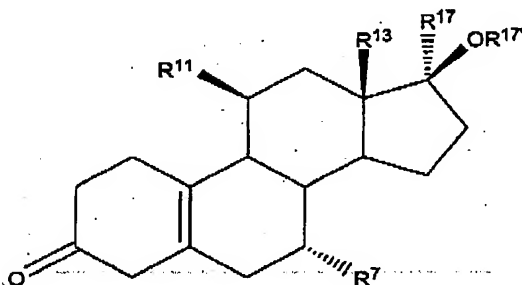
Im ersten Fall ($U-V-W-X-Y-Z = C^1-C^2-C^3-C^4=C^5-C^{10}$) handelt es sich um Steroide mit der allgemeinen Formel **10**:

13



10

Im zweiten Fall (U-V-W-X-Y-Z = C¹-C²-C³-C⁴-C⁵=C¹⁰) handelt es sich um Steroide mit der allgemeinen Formel **12**:



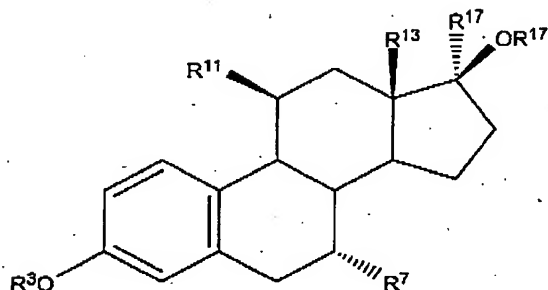
12

5

Bei den Verbindungen mit den allgemeinen Formeln **10** und **12** handelt es sich um androgene Verbindungen.

- 10 Im dritten Fall (U-V-W-X-Y-Z = C¹=C²-C³=C⁴-C⁵=C⁶) handelt es sich um Steroide mit der allgemeinen Formel **8**:

14



8

Diese Verbindungen sind Estrogene (Estrogenrezeptor-affine Verbindungen).

- 5 In allen drei Fällen haben die Reste R^3 , R^7 , R^{10} , R^{11} , R^{13} , R^{17} und $R^{17'}$ dieselben Bedeutungen wie die entsprechenden Reste in der allgemeinen Formel **8,10,12**.

- 10 Vorzugsweise stehen unabhängig voneinander R^1 für H und/oder R^7 für CH_3 und/oder R^{11} für Fluor und/oder R^{13} für CH_3 und/oder R^{17} für H, CH_3 , C_1 - bis C_{18} -Alkynyl, insbesondere Ethinyl, CH_2CN oder CF_3 und/oder $R^{17'}$ für H.

Besonders geeignete erfindungsgemäße $7\alpha,17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidoide mit der allgemeinen Formel **8,10,12** sind:

15

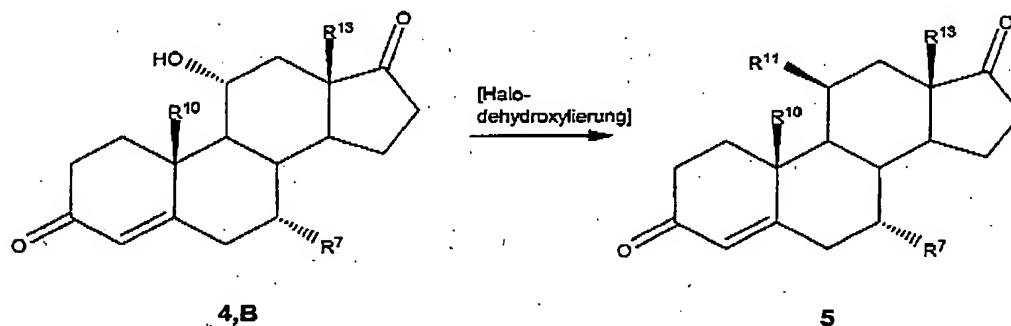
- 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on (Formel **10**)
 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-5(10)-en-3-on (Formel **12**)
 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol (Formel **8**).

- 20 Zur Herstellung dieser Verbindungen können folgende Herstellungsverfahren eingeschlagen werden:

Zur Herstellung von $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **10**, in denen U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur

$C^1-C^2-C^3-C^4=C^5-C^{10}$ steht, werden als Ausgangssubstanzen die mit dem erfindungsgemäßen mikrobiologischen Herstellungsverfahren erhältlichen 7α -substituierten 11α -Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel **4,B** eingesetzt.

- 5 In einem ersten Syntheseschritt werden diese so erhaltenen 7α -substituierten 11α -Hydroxysteroiden durch nukleophile Substitution mit einem Halodehydroxylierungsreagens in die entsprechenden 7α -substituierten 11β -Halogensteroiden **5** umgewandelt:



10

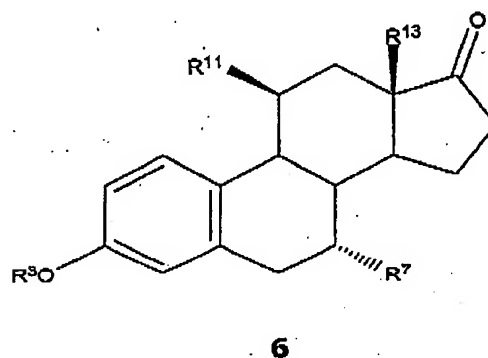
Als Halodehydroxylierungsreagentien kommen alle hierfür üblichen Verbindungen in Frage, beispielsweise Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodwasserstoffsäure, Thionylchlorid oder Thionylbromid, Phosphorpentachlorid, Phosphoroxychlorid, N-Chlorsuccinimid, Triphenylphosphin/Tetrachlorkohlenstoff, HF/Pyridin oder Diethylaminoschwefeltrifluorid oder vorzugsweise Nonafluyfluorid/1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undecen.

15

- 20 Aus **5** wird anschließend durch selektive Alkylierung an C^{17} des Ringgerüsts die Verbindung **10** hergestellt (siehe hierzu Schema I). Zur selektiven Alkylierung können übliche Alkylierungsreagentien verwendet werden, beispielsweise Grignardverbindungen und organometallische Verbindungen, insbesondere Alkyllithium-Verbindungen. Beispielsweise kann zur Herstellung des entsprechenden 17α -Ethinyl- 17β -hydroxy-estr-4-en-3-ons aus dem Estr-4-en-3,17-dion
- 25 Ethinylmagnesiumbromid als Alkylierungsagens verwendet werden.

Zur Herstellung der $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden, in denen

- U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur $C^1-C^2-C^3-C^4-C^5=C^{10}$ steht und die die allgemeine Formel **12** haben, werden die Verbindungen mit der allgemeinen Formel **10** eingesetzt und isomerisiert, so daß die Δ^4 -Doppelbindung in eine $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert wird. Um die 3-Ketogruppe zu schützen, wird hierzu
- 5 zunächst ein cyclischer Ether in 3-Stellung gebildet. Anschließend wird die Δ^4 -Doppelbindung in die $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert, wobei sich das 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **12** bildet, und die Schutzgruppe wieder abgespalten.
- 10 Zur Herstellung der weiteren 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **8**, in denen U-V-W-X-Y-Z für $C^1=C^2-C^3-C^4-C^5=C^{10}$ steht, wird wie folgt vorgegangen:
- Zunächst wird wie zuvor bereits beschrieben, aus dem durch mikrobiologische
- 15 Hydroxylierung und Oxidation erhaltenen 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** durch Halodehydroxylierung in einer nukleophilen Substitutionsreaktion das entsprechende 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **5** gebildet.
- 20 Aus diesem wird dann durch Oxidation, beispielsweise mit einem Kupfer(II)-Salz, ein 7 α -substituiertes Estra-1,3,5(10)-trien mit der allgemeinen Formel **6** gebildet:



worin R^3 , R^7 , R^{11} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie vorstehend bezeichnet. Sofern R^3 für H steht, können diese Verbindungen unmittelbar synthetisiert werden. Soll ein anderer Rest als H für R^3 stehen, müssen die entsprechenden Ether oder Ester auf bekannte Weise gebildet werden, nachdem
5 der 1,3,5(10)-Trienring durch Oxidation gebildet worden ist.

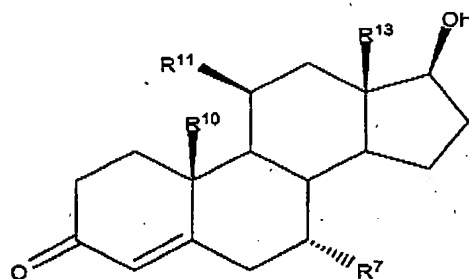
Auch die 7 α -substituierten 11 β -Halogenestra-1,3,5(10)-triene mit der allgemeinen Formel **6** sowie deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze, Ester und Amide sind neu und werden daher als Zwischenprodukte bei der Synthese
10 der ebenfalls erfindungsgemäßen 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **8** beansprucht.

Ein besonders bevorzugtes 7 α -substituiertes 11 β -Halogenestra-1,3,5(10)-trien mit der allgemeinen Formel **6** ist 11 β -Fluor-3-hydroxy-7 α -methylestra-1,3,5(10)-
15 trien-17-on.

Aus dem 7 α -substituierten 11 β -Halogenestra-1,3,5(10)-trien mit der allgemeinen Formel **6** kann in gleicher Weise, wie zuvor für die Synthese der Verbindung mit der allgemeinen Formel **10** beschrieben ist, durch selektive Alkylierung am C¹⁷ des Ringgerüsts das erfindungsgemäße 7 α ,17 α -substituierte 11 β -
20 Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **8** gebildet werden.

Weiterhin können aus den durch mikrobiologische Hydroxylierung und Oxidation aus den 7 α -substituierten Steroiden mit der allgemeinen Formel **3,A** oder **D**
25 gewonnenen Substanzen mit der allgemeinen Formel **4,B** auch die 7 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **9** hergestellt werden, die ebenfalls androgene Wirkung aufweisen:

18

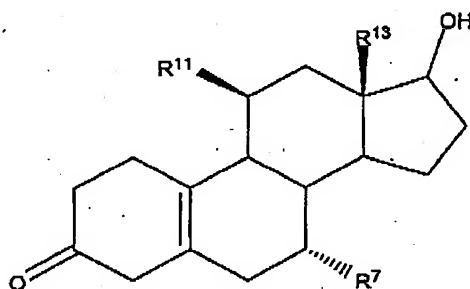


9

wobei R^7 , R^{11} und R^{13} dieselben Bedeutungen wie zuvor angegeben haben. Eine besonders bevorzugte Verbindung ist 11 β -Fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on. Die Verbindungen mit der allgemeinen Formel 9 sowie deren pharmazeutisch verträglichen Additionssalze, Ester und Amide weisen ebenfalls androgene Wirkung auf.

Zur Herstellung der Verbindungen mit der allgemeinen Formel 9 wird das Estr-4-en-3,17-dion 5 zum 17 β -Hydroxy-estr-4-en-3-on 9 reduziert, beispielsweise mit einem Borhydrid.

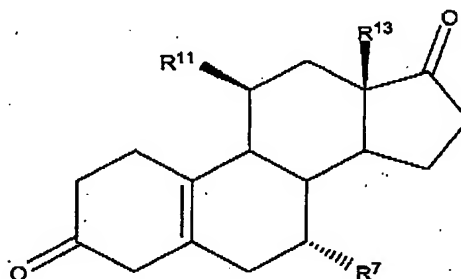
Die Verbindungen mit der allgemeinen Formel 9 können weiterhin in die entsprechenden 7 α -substituierten 11 β -Halogenestra-5(10)-ene:



wobei R^7 , R^{10} , R^{11} und R^{13} die Bedeutungen wie in der allgemeinen Formel 8, 10, 12 haben,

umgewandelt werden. Hierzu werden die Verbindungen mit der allgemeinen Formel 9 durch Verschiebung der Δ^4 -Doppelbindung in eine $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert. Um die 3-Ketogruppe zu schützen, wird hierzu zunächst ein cyclischer Ether in 3-Stellung gebildet. Anschließend wird die Δ^4 -Doppelbindung in die $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert, wobei sich das vorstehend angegebene 7 α -substituierte 11 β -Halogensteroid bildet, und die Schutzgruppe anschließend wieder abgespalten.

Schließlich können aus den Verbindungen mit der allgemeinen Formel 5 durch Isomerisierung der Δ^4 -Doppelbindung in die $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung auch die entsprechenden 7 α -substituierten 11 β -Halogenestra-5(10)-ene:



wobei R^7 , R^{10} , R^{11} und R^{13} die Bedeutungen wie in der allgemeinen Formel 8,10,12 haben,

umgewandelt werden. Hierzu werden die Verbindungen mit der allgemeinen Formel 5 durch Verschiebung der Δ^4 -Doppelbindung in eine $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert. Um die 3-Ketogruppe zu schützen, wird hierzu wiederum zunächst ein cyclischer Ether in 3-Stellung gebildet. Anschließend wird die Δ^4 -Doppelbindung in die $\Delta^{5(10)}$ -Doppelbindung isomerisiert, wobei sich das vorstehend angegebene 7 α -substituierte 11 β -Halogensteroid bildet, und die Schutzgruppe schließlich wieder abgespalten.

Alle genannten Verbindungen können auch weiter verestert oder verethert werden, sofern entsprechende Hydroxygruppen in 3- oder 17 β -Stellung vorhanden sind. Beispielsweise kann die Verbindung 9 in einen entsprechenden 17 β -Ether

oder 17 β -Ester umgewandelt werden. Eine bevorzugte Verbindung ist 11 β -Fluor-17 β -(4-sulfamoylbenzoxy)-7 α -methylestr-4-en-3-on. Als Substituenten am Oxy-Sauerstoffatom an C¹⁷ kommen grundsätzlich dieselben Reste in Frage, die auch für R¹⁷ angegeben sind.

5

Insbesondere die 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **8,10,12** sind geeignet zur Herstellung von Arzneimitteln. Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung der genannten Verbindungen mit der allgemeinen Formel **8,10,12** zur Herstellung von Arzneimitteln sowie auf pharmazeutische Präparate, die mindestens eine der genannten Verbindungen mit der allgemeinen Formel **8,10,12** sowie mindestens einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten.

10

15

Bei den erfindungsgemäßen 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **10,12** handelt es sich um Verbindungen mit stark androgener Wirkung ohne die genannten Nebenwirkungen, beispielsweise Stimulation der Prostata (insbesondere keine benigne Prostatahyperplasie). Die Verbindungen sind leicht synthetisierbar. Es zeigt sich, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen mit der allgemeinen Formel **10** oder **12** nicht nur zur männlichen HRT eingesetzt werden können, sondern daß sich diese Verbindungen auch ohne zusätzliche Verabreichung von weiteren Wirkstoffen als wirksame männliche Kontrazeptiva eignen, wenn eine ausreichende Dosierung vorgenommen wird, um den Blutspiegel von LH, von im Körper produziertem Testosteron sowie von FSH (follikelstimulierendes Hormon) genügend abzusenken. Dies liegt daran, daß die erfindungsgemäßen 11 β -Halogensteroiden die Ausschüttung von LH und FSH inhibieren. LH stimuliert die Leydig-Zellen, so daß Testosteron sezerniert wird. Wird der Blutspiegel von LH niedrig gehalten, sinkt auch die körpereigene Testosteronausschüttung. Testosteron wird für die Spermatogenese benötigt, während FSH die Keimzellen stimuliert. Daher sind für eine wirksame Spermatogenese ausreichend hohe FSH- und LH-Blutspiegel erforderlich, wobei ein ausreichend hoher LH-Blutspiegel zu der für die Spermatogenese erforderlichen Testosteron-Ausschüttung führt.

20

25

30

Da eine Behandlung ausschließlich mit den $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden ohne zusätzliche Wirkstoffe zur Sterilisation bereits zur wirksamen männlichen Kontrazeption führen kann, kann die Verabreichung eines hierfür geeigneten Arzneimittels wesentlich vereinfacht und die Kosten der Anwendung deutlich gesenkt werden.

Die erfindungsgemäßen $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden können auch in Kombination mit einem Gestagen eingesetzt werden, um die männliche Fertilität zu kontrollieren.

Überdies inhibieren die erfindungsgemäßen $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden wirksam 5α -Reduktase und die Steroid-11-Hydroxylase [CYP11B (P450c11), G.Zhang, W.L.Miller, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 81, Seiten 3254-3256 (1996)], so daß beispielsweise selektiv die Stimulation der Prostata vermieden wird und diese Verbindungen eine verbesserte Pharmakokinetik aufweisen. Die Inhibition der 11-Hydroxylase führt zu einer verminderten Desaktivierung der androgenen Verbindungen und zu deren verminderter Ausscheidung aus dem menschlichen Körper. Dadurch sind die Wirksamkeit und Wirkdauer dieser Verbindungen gegenüber bekannten Verbindungen insbesondere nach oraler Applikation verbessert.

Aus den vorstehenden Gründen eignen sich diese Verbindungen besonders zur Anwendung in der männlichen Fertilitätskontrolle sowie zur Androgensersatztherapie mit verminderter Neigung zur 5α -Reduktion bei gleichzeitig erhaltener Aromatisierbarkeit zu estrogenen Steroiden und günstigem Einfluß auf Serumlipide und das Zentralnervensystem.

Die androgene Wirkung und die Feststellung, dass die genannten Nebenwirkungen nicht auftreten, wurde mit einem Samenblasentest für die erfindungsgemäßen Verbindungen mit den allgemeinen Formeln **10** und **12** ermittelt. Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen mit der allgemeinen Formel **8** wurde mit einem Uteruswachstumstest auf estrogenen Wirkung überprüft.

Die erfindungsgemäßen 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroidoide mit der allgemeinen Formel 10 oder 12 bzw. die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate, die diese Verbindungen enthalten, eignen sich hervorragend zur Behandlung von nicht-sterilen männlichen Personen sowie grundsätzlich auch von männlichen Säugetieren. Eine Anwendung zur männlichen Kontrazeption führt dazu, daß die männlichen Personen nur vorübergehend steril werden. Nach Beendigung der Anwendung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe bzw. der pharmazeutischen Präparate wird der ursprüngliche Zustand wieder erreicht, so daß die männliche Person nicht mehr steril ist und die Spermatogenese wieder im ursprünglichen Umfange stattfindet. Um den Zustand der vorübergehenden Sterilität über einen gewünschten Zeitraum konstant zu erreichen, ist die Verabreichung des Wirkstoffes bzw. des Präparats kontinuierlich durchzuführen, wobei die Verabreichung je nach der Anwendungsform täglich, in einem kürzeren oder auch in einem größeren Zeitabstand periodisch zu wiederholen ist. Nach Beendigung der einmaligen oder wiederholten Verabreichung des Wirkstoffes oder des Präparats wird der nicht-sterile Zustand der männlichen Person gegebenenfalls nicht sofort sondern erst langsam wiederhergestellt, wobei die hierfür erforderliche Zeitspanne von verschiedenen Faktoren, beispielsweise von der Dosierung, der Körperkonstitution der Person und der parallelen Gabe anderer Arzneimittel, abhängt.

Falls der Zweck der Anwendung in der Kontrazeption besteht, muß die Dosierung der 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroidoide so hoch eingestellt werden, daß die Blutspiegel von LH und FSH jeweils höchstens 2,5 I.E./ml (I.E.: Internationale Einheiten), insbesondere höchstens 1,0 I.E./ml, und von Testosteron höchstens 10 nmol/l, insbesondere höchstens 3 nmol/l, betragen.

Falls die erfindungsgemäßen 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroidoide zur HRT eingesetzt werden sollen, ohne daß eine Kontrazeption erreicht werden soll, wird die Dosierung niedriger angesetzt. Für diesen Fall werden Wirkspiegel angestrebt, die Blutspiegel für LH und FSH von jeweils mehr als 2,5 I.E./ml und für Testosteron von mehr als 10 nmol/l ermöglichen.

Die zur Einstellung des Blutspiegels von LH, FSH und Testosteron benötigten Dosierungen der erfindungsgemäßen $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel 10 oder 12 hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab und müssen daher anwendungsspezifisch bestimmt werden. Zunächst ist die Dosierung natürlich von der Art der Therapie abhängig. Falls die Verbindungen zur männlichen Kontrazeption eingesetzt werden sollen, müssen wesentlich höhere Dosen gegeben werden als bei einem Einsatz zur HRT. Ferner richtet sich die Dosierung auch nach der Art des $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroids und dessen Bioverfügbarkeit. Ferner ist die Art der Anwendung wesentlich für die zu applizierende Menge. Schließlich hängt die Dosierung auch von der Körperkonstitution der anwendenden Person und von weiteren Faktoren ab, beispielsweise dem Umstand, ob parallel weitere Arzneimittel gegeben werden.

Die Verbindungen können oral und parenteral, beispielsweise *i.p.* (intraperitoneal), *i.v.* (intravenös), *i.m.* (intramuskulär) oder perkutan, verabreicht werden. Die Verbindungen können auch in das Gewebe implantiert werden. Die zu verabreichende Menge der Verbindungen kann innerhalb eines weiten Bereiches schwanken, soweit eine wirksame Menge appliziert wird. In Abhängigkeit von dem zu behandelnden Zustand und der Art der Darreichung kann die Menge der verabreichten Verbindung in einem weiten Bereich variieren. Beim Menschen liegt die tägliche Dosis im Bereich von 0,1 bis 100 mg. Die bevorzugte tägliche Dosierung beim Menschen beträgt 0,1 bis 10 mg. Die Dauer der Anwendung hängt von dem zu erreichenden Zweck ab.

Zur Anwendung kommen Kapseln, Pillen, Tabletten, Dragées, Cremes, Salben, Lotionen, Flüssigkeiten, wie Sirupe, Gele, injizierbare Flüssigkeiten, beispielsweise zur *i.p.*-, *i.v.*-, *i.m.*- oder perkutanen Injektion, usw. in Frage, wobei die einzelnen Darreichungsformen die erfindungsgemäßen Verbindungen je nach deren Art allmählich oder die gesamte Menge in kurzer Zeit an den Körper abgeben.

Zur oralen Verabreichung werden Kapseln, Pillen, Tabletten, Dragées und Flüssigkeiten oder andere bekannte orale Darreichungsformen als pharmazeu-

tische Präparate eingesetzt. In diesem Falle können die Arzneimittel in der Weise formuliert sein, daß sie die Wirkstoffe entweder in kurzer Zeit freisetzen und an den Körper abgeben oder eine Depotwirkung aufweisen, so daß eine länger anhaltende, langsame Zufuhr von Wirkstoff zum Körper erreicht wird. Die Dosierungseinheiten können neben dem $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroid

5 einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Träger enthalten, beispielsweise Stoffe zur Einstellung der Rheologie des Arzneimittels, oberflächenaktive Stoffe, Lösungsvermittler, Mikrokapseln, Mikropartikel, Granulate, Verdünner, Bindemittel, wie Stärke, Zucker, Sorbit und Gelatine, ferner Füll-

10 stoffe, wie Kieselsäure und Talkum, Gleitmittel, Farbstoffe, Duftstoffe und andere Stoffe.

Die erfindungsgemäßen $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden können insbesondere auch in Form einer Lösung formuliert werden, die für die orale

15 Verabreichung bestimmt ist und die neben dem aktiven 11β -Halogensteroid als folgende Bestandteile ein pharmazeutisch verträgliches Öl und/oder eine pharmazeutisch verträgliche lipophile, oberflächenaktive Substanz und/oder eine pharmazeutisch verträgliche hydrophile, oberflächenaktive Substanz und/oder ein pharmazeutisch verträgliches mit Wasser mischbares Lösungsmittel enthält.

20 Hierzu wird außerdem auf WO-A-97/21440 verwiesen.

Um eine bessere Bioverfügbarkeit des Steroids zu erreichen, können die Verbindungen auch als Cyclodextrinchlatrate formuliert werden. Hierzu werden die Verbindungen mit α -, β - oder γ -Cyclodextrin oder deren Derivaten umgesetzt.

25 Falls Cremes, Salben, Lotionen und äußerlich anwendbare Flüssigkeiten eingesetzt werden sollen, müssen diese so beschaffen sein, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen dem Körper in ausreichender Menge zugeführt werden. In diesen Darreichungsformen sind Hilfsstoffe enthalten, beispielsweise Stoffe

30 zur Einstellung der Rheologie der Arzneimittel, oberflächenaktive Mittel, Konservierungsmittel, Lösungsvermittler, Verdünner, Stoffe zur Erhöhung der Permeationsfähigkeit für die erfindungsgemäßen Steroide durch die Haut, Farbstoffe, Duftstoffe und Hautschutzmittel, wie Konditionierer und Feuchteregulato-

ren. Zusammen mit den erfindungsgemäßen Steroiden können auch andere Wirkstoffe in dem Arzneimittel enthalten sein.

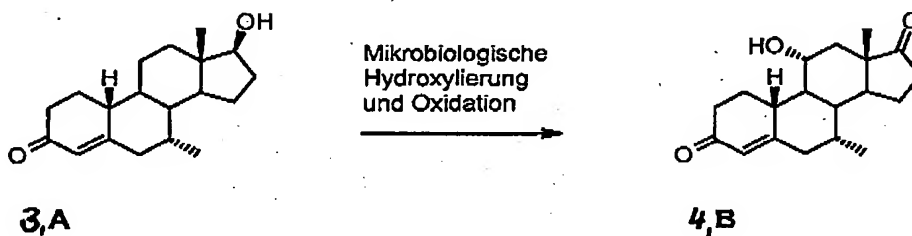
5 Zur parenteralen Verabreichung können die Wirkstoffe in einem physiologisch verträglichen Verdünnungsmittel gelöst oder suspendiert sein. Als Verdünnungsmittel werden sehr häufig Öle mit oder ohne Zusatz eines Lösungsvermittlers, eines oberflächenaktiven Mittels, eines Suspendier- oder Emulgiermittels verwendet. Beispiele für verwendete Öle sind Olivenöl, Erdnußöl, Baumwollsaamenöl, Sojabohnenöl, Rizinusöl und Sesamöl. Zur Formulierung eines
10 injizierbaren Präparats kann ein beliebiger flüssiger Träger verwendet werden, in dem die erfindungsgemäßen Verbindungen gelöst oder emulgiert sind. Diese Flüssigkeiten enthalten häufig auch Stoffe zur Regulation der Viskosität, oberflächenaktive Stoffe, Konservierungsstoffe, Lösungsvermittler, Verdünner und weitere Zusatzstoffe, mit denen die Lösung isotonisch eingestellt wird. Zusammen mit den $7\alpha,17\alpha$ -substituierten 11β -Halogensteroiden können auch andere
15 Wirkstoffe verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen 11β -Halogensteroiden lassen sich so in Form einer Depotinjektion oder eines Implantatpräparats, beispielsweise subkutan, anwenden,
20 die so formuliert sein können, daß eine verzögerte Wirkstoff-Freigabe ermöglicht wird. Hierzu können bekannte Techniken eingesetzt werden, beispielsweise sich auflösende oder mit einer Membran arbeitende Depots. Implantate können als inerte Materialien beispielsweise biologisch abbaubare Polymere enthalten oder synthetische Silikone, beispielsweise Silikonkautschuk. Die erfindungsgemäßen 11β -Halogensteroiden können ferner zur perkutanen Verabreichung beispielsweise in ein Pflaster eingearbeitet werden.
25

Die nachfolgend angegebenen Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung:
30

A. Mikrobiologische Synthese:11 α -Hydroxy-7 α -methyl-estr-4-en-3,17-dion (Verbindung **4,B**):

5

Beispiel 1:

Ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der 1000 ml einer 30 min bei 121°C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 3 Gew.-% Glucose, 1 Gew.-% Maisquellwasser, 0,2 Gew.-% NaNO₃, 0,1 Gew.-% KH₂PO₄, 0,2 Gew.-% K₂HPO₄, 0,05 Gew.-% KCl, 0,05 Gew.-% MgSO₄·7H₂O und 0,002 Gew.-% FeSO₄·7H₂O (pH 6,0) enthielt, wurde mit einer Schrägröhrchen-Kultur des Stammes *Gnomonia cingulata* (CBS 15226) beimpft und 72 h lang bei 28°C auf einem Rotationsschüttler mit 165 UpM geschüttelt. Mit dieser Vorzucht wurde ein 20 l-Fermenter beimpft, der mit 19 l sterilem Medium der gleichen Endzusammensetzung, wie für die Vor-

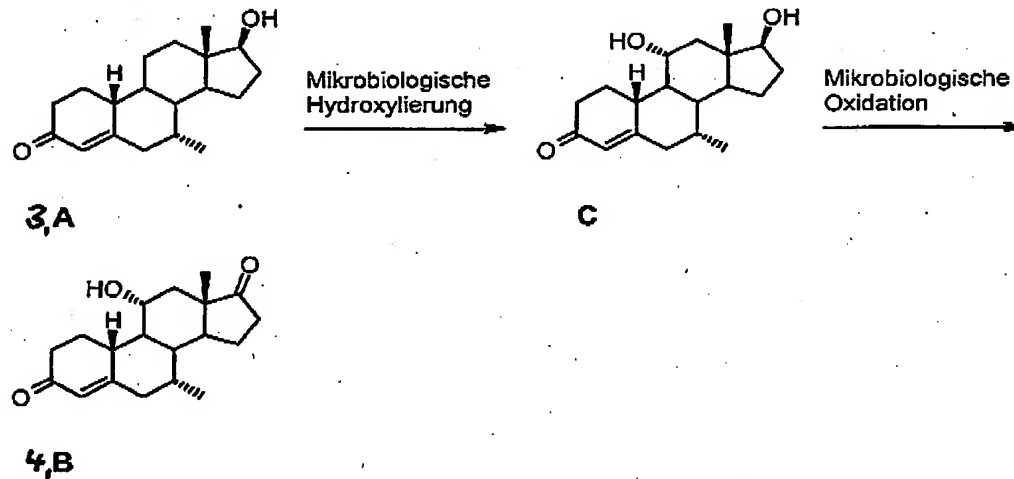
15

20 kultur beschrieben, beschickt war. Außerdem wurden vor dem Sterilisieren noch 1,0 ml Siliconöl und 1,0 ml Synperonic (Oxoalkoholethoxylat) zur Schaumbekämpfung zugegeben. Nach einer Anwuchsphase von 12 h bei 0,7 bar Überdruck, einer Temperatur von 28°C, einer Belüftung von 20 l/min und einer Rührgeschwindigkeit von 250 UpM wurde eine Lösung von 4,0 g 17 β -Hydroxy-

25 7 α -methylestr-4-en-3-on in 40 ml DMF zugegeben. Es wurde weitergerührt und belüftet. Nach 135 h wurde die Kulturbrühe geerntet und 12 h lang mit 10 l Methylisobutylketon und 5 h lang mit 5 l Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bis zur Trockene eingeeengt. Das Siliconöl wurde mit Hexan herausgewaschen. Nach Chromatographie an Kieselgel mit

einem Gradienten aus Hexan und Ethylacetat wurden 1,64 g (39 %) 11 α -Hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3,17-dion isoliert.

5 Beispiel 2:



- 10 Ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der 1000 ml einer 30 min lang bei 121 °C im Autokla-
 ven sterilisierten Nährlösung aus 3 Gew.-% Glucose, 1 Gew.-% Maisquellwas-
 ser, 0,2 Gew.-% NaNO₃, 0,1 Gew.-% KH₂PO₄, 0,2 Gew.-% K₂HPO₄,
 0,05 Gew.-% KCl, 0,05 Gew.-% MgSO₄·7H₂O, und 0,002 Gew.-% FeSO₄·7H₂O
 (pH 6,0) enthält, wurde mit einer Schrägröhrchen-Kultur des Stammes *Glome-*
 15 *rella cingulata* (IFO 6425) beimpft und 72 h lang bei 28°C auf einem Rotations-
 schüttler mit 165 UpM geschüttelt. Mit dieser Vorzucht wurde ein 20 l Fermenter
 beimpft, der mit 19 l sterilem Medium der gleichen Endzusammensetzung, wie
 für die Vorkultur beschrieben, beschickt war. Außerdem wurden vor dem Sterili-
 sieren noch 1,0 ml Siliconöl und 1,0 ml Synperonic zur Schaumbekämpfung
 20 zugegeben. Nach einer Anwuchsphase von 12 h bei 0,7 bar Überdruck, einer
 Temperatur von 28°C, einer Belüftung von 10 l/min und einer Rührgeschwin-
 digkeit von 350 UpM wurde eine Lösung von 2,0 g 17 β -Hydroxy-7 α -methylestr-
 4-en-3-on in 30 ml DMF zugegeben. Es wurde weitergerührt und belüftet. Nach
 19 h wurde die Kulturbrühe geerntet und 16 h lang mit 20 l Methylisobutylketon

- und 23 h lang mit 20 l Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bis zu Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol weitgehend gelöst. Das Siliconöl wurde abfiltriert. Es wurde eingengt, und nach Chromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten aus Dichlormethan und Aceton wurden 1,55 g (73 %) 11 α ,17 β -Dihydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on isoliert. Nach der Umkristallisation aus Aceton/Diisopropylether wurden 827 mg (39 %) weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 163°C und $[\alpha]_D = -16^\circ$ (CHCl₃, c = 0,501) isoliert.
- 10 Ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 min lang bei 121 °C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 0,5 Gew.-% Glucose, 0,5 Gew.-% Bacto-Hefeextrakt, 0,1 Gew.-% Pepton und 0,2 Gew.-% Maisquellwasser (pH 7,5) enthielt, wurde mit vier Kryo-Kugeln einer Kultur des Stammes *Bacillus sphaericus* (ATCC 7055) beimpft und 24 h lang bei 28°C auf einem Rotationsschüttler mit 165 UpM geschüttelt. Mit dieser Vorzucht wurden vier 2 l Erlenmeyerkolben, die 500 ml steriles Medium der gleichen Zusammensetzung, wie für die Vorkultur beschrieben, enthielten, mit je 10 % dieser Kulturbrühe beimpft. Nach einer Anwuchsphase von 4 h bei einer Temperatur von 28°C auf einem Rotationsschüttler mit 165 UpM wurde in jeden Kolben eine Lösung von 50 mg 11 α ,17 β -Dihydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on in 2,5 ml DMF gegeben. Es wurde 48 h weitergeschüttelt. Die vereinigten Kulturbrühen wurden zweimal mit 2 l Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zu Trockne eingengt. Dabei wurden 630 mg eines ölig-kristallinen Rückstands erhalten. Nach der Umkristallisation aus Aceton/Diisopropylether wurden 103 mg (49,2 %) gelbliche Kristalle vom Schmelzpunkt 189°C und $[\alpha]_D = +40,4^\circ$ (CHCl₃, c = 0,529) isoliert (Direktkristallisation ohne vorherige chromatographische Aufreinigung).

Beispiel 3:

- 5 Ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 min lang bei 121 °C im Autokla-
ven sterilisierten Nährlösung aus 3 Gew.-% Glucose, 1 Gew.-% Maisquellwas-
ser, 0,2 Gew.-% NaNO₃, 0,1 Gew.-% KH₂PO₄, 0,2 Gew.-% K₂HPO₄,
0,05 Gew.-% KCl, 0,05 Gew.-% MgSO₄·7H₂O, und 0,002 Gew.-% FeSO₄·7H₂O
10 (pH 6,0) enthielt, wurde mit einer halben Schrägröhrchen-Kultur des Stammes
Aspergillus ochraceus (CBS 13252) beimpft und 72 h lang bei 28°C auf einem
Rotationsschüttler mit 165 UpM geschüttelt. Mit dieser Vorzucht wurde ein 10 l
Fermenter beimpft, der mit 9,5 l sterilem Medium der gleichen Endzusammen-
setzung, wie für die Vorkultur beschrieben, beschickt war. Außerdem wurden
15 vor dem Sterilisieren noch 0,5 ml Siliconöl und 0,5 ml Synperonic zur Schaum-
bekämpfung zugegeben. Nach einer Anwuchsphase von 6 h bei 0,7 bar Über-
druck, einer Temperatur von 28°C, einer Belüftung von 5 l/min und einer Rühr-
geschwindigkeit von 350 UpM wurde eine Lösung von 1,0 g 7α-Methylestr-4-
en-3,17-dion in 15 ml DMF zugegeben. Es wurde weitergerührt und belüftet.
20 Nach 22 h wurde die Kulturbrühe geerntet und zweimal 4 h lang mit 7 l Methyl-
isobutylketon extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bis zur
Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol weitgehend gelöst. Das
Siliconöl wurde abfiltriert. Es wurde eingengt, und nach Chromatographie an
Kieselgel mit einem Gradienten aus Dichlormethan und Aceton wurden 0,78 g
25 (74 %) 11α-Hydroxy-7α-methylestr-4-en-3,17-dion isoliert. Nach der Umkristalli-
sation aus Aceton/Diisopropylether wurden 311 mg (29,6 %) weiße Kristalle
vom Schmelzpunkt 200°C und [α]_D = +52° (CHCl₃, c = 0,5905) isoliert.

B. Chemisches Herstellungsverfahren:**Beispiel 4: Herstellung von 11 β -Fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on:**

5

a) 11 β -Fluor-7 α -methyl-estr-4-en-3,17-dion:

Zu einer Lösung von 13,08 g 11 α -Hydroxy-7 α -methyl-estr-4-en-3,17-dion (hergestellt mittels erfindungsgemäßer mikrobiologischer Synthese [Teil A]) in 10 250 ml Toluol und 18,2 ml 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en wurden bei 0°C 11,5 ml Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid getropft. Nach 1 h wurde mit 2M-Salzsäure neutralisiert, auf Wasser gegeben, viermal mit Ethylacetat extrahiert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, getrocknet und im Vakuum 15 eingeengt. Nach Chromatographieren des Rohproduktes an Kieselgel mit einem Hexan/Ethylacetat-Gradienten wurden 8,7 g 11 β -Fluor-7 α -methyl-estr-4-en-3,17-dion erhalten. Schmelzpunkt: 101,4°C, $[\alpha]_D$: +135,8° (CHCl₃).

b) 11 β -Fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on:

Eine Lösung von 8,7 g 11 β -Fluor-7 α -methyl-estr-4-en-3,17-dion in 148 ml 20 Tetrahydrofuran wurde bei 0°C mit 29,5 ml 1M-Lithiumaluminiumtri-*tert*-butoxyhydrid in Tetrahydrofuran tropfenweise versetzt und 5,5 h lang bei 0°C gerührt. Anschließend wurde bei 0°C verdünnte Schwefelsäure zugegeben, und die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser gegeben, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. eingeengt, und an 25 Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat chromatographiert. Es wurden 5,8 g 11 β -Fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on, vom Schmelzpunkt 143-144°C erhalten. $[\alpha]_D$ = +89,9° (CHCl₃).

Beispiel 5: Herstellung von 11 β -Fluor-17 β -(4-sulfamoylbenzoxy)-7 α -methylestr-4-en-3-on:

- 5 Eine Lösung von 500 mg 11 β -Fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on in 7,5 ml Pyridin wurde bei Raumtemperatur mit 750 mg 4-Sulfamoylbenzoesäure, 800 mg N,N-Dicyclohexylcarbodiimid sowie 125 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 8,5 h lang gerührt. Dann wurde auf Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben, viermal mit Dichlormethan extrahiert, neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingeengt und an Kieselgel mit Dichlormethan/ Aceton chromatographiert. Es wurden 302 mg 11 β -Fluor-17 β -(4-sulfamoylbenzoxy)-7 α -methylestr-4-en-3-on vom Schmelzpunkt 232°C erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +100.5^\circ$ (CHCl₃).

15 **Beispiel 6:** Herstellung von 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on:

a) 11 β -Fluor-3-methoxy-7 α -methylestra-3,5-dien-17-on:

- 20 Eine Lösung von 2 g 11 β -Fluor-7 α -methylestr-4-en-3,17-dion in 20 ml 2,2-Dimethoxypropan wurde mit 200 mg Pyridiniumtosylat 6,5 h lang bei 80°C gerührt. Dann wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und *i. Vak.* eingeengt. Es wurden 2 g rohes 11 β -Fluor-3-methoxy-7 α -methylestra-3,5-dien- 25 17-on erhalten.

b) 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on:

- 30 Eine Lösung von 9,17 g Cer-III-chlorid in 60 ml Tetrahydrofuran wurde bei 0°C tropfenweise mit 74,2 ml einer Ethinylmagnesiumbromid-Lösung (0,5 M in Tetrahydrofuran) versetzt und 1 h lang bei 0°C gerührt. Anschließend wurden eine Lösung von 2 g des rohen 11 β -Fluor-3-methoxy-7 α -methylestra-3,5-dien-17-on in 40 ml Tetrahydrofuran tropfenweise zugegeben und weitere 3,5 h lang bei 0°C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde eine gesättigte Ammoniumchlorid-Lö-

sung zugesetzt, auf Wasser gegeben, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, mit halbkonzentrierter Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingeengt und an Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat chromatographiert. Es wurden 1,15 g reines
5 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on vom Schmelzpunkt 218-220°C erhalten. $[\alpha]_D = +19.2^\circ$ (CHCl₃).

Beispiel 7: Herstellung von 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-
10 5(10)-en-3-on:

a) 3,3-Ethandiyldioxy-17 α -ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestr-5(10)-en-17 β -ol:

Eine Lösung von 700 mg 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-
15 en-3-on in 7 ml Dichlormethan und 4,7 ml Ethylenglykol wurde mit 2,3 ml Trimethylorthoformiat und 30 mg *p*-Toluolsulfonsäurehydrat 6,5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde auf Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingeengt und an Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat chroma-
20 tographiert. Es wurden 205 mg 3,3-Ethandiyldioxy-17 α -ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestr-5(10)-en-17 β -ol erhalten.

b) 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-5(10)-en-3-on:

Eine Lösung von 205 mg 3,3-Ethandiyldioxy-17 α -ethinyl-11 β -fluor-7 α -methyl-
25 estr-5(10)-en-17 β -ol in 27 ml Methanol und 3,6 ml Wasser wurde mit 361 mg Oxalsäure 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde auf Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingeengt und an Kieselgel
30 mit Hexan/Ethylacetat chromatographiert. Es wurden 95 mg 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-5(10)-en-3-on vom Schmelzpunkt 112-114°C erhalten.

Beispiel 8: Herstellung von 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol:

a) 11 β -Fluor-3-hydroxy-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-17-on:

- 5 Eine Lösung von 500 mg 11 β -Fluor-7 α -methylestr-4-en-3,17-dion in 16,5 ml Acetonitril wurde mit 400 mg Kupfer-II-bromid 6,5 h lang bei 25°C gerührt. Dann wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingengt und an Kieselgel mit Hexan/Aceton chromatographiert. Es wurden 280 mg
- 10 reines 11 β -Fluor-3-hydroxy-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-17-on vom Schmelzpunkt 185-186°C erhalten.

b) 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol:

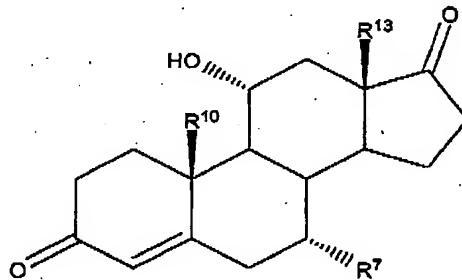
- 15 Eine Suspension von 2,03 g Cer-III-chlorid in 7,5 ml Tetrahydrofuran wurde bei 0°C tropfenweise mit 16,5 ml einer Ethinylmagnesiumbromid-Lösung (0,5 M in Tetrahydrofuran) versetzt und 0,5 h lang bei 0°C gerührt. Anschließend wurden eine Lösung von 280 mg 11 β -Fluor-3-hydroxy-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-17-on in 2,8 ml Tetrahydrofuran tropfenweise zugegeben und weitere 3,5 h lang bei 0°C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde eine gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung
- 20 zugesetzt, auf Wasser gegeben, viermal mit Ethylacetat extrahiert, neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, *i. Vak.* eingengt und an Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat chromatographiert.

- 25 Es wurden 220 mg 17 α -Ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol vom Schmelzpunkt 115-117°C erhalten.

34

Patentansprüche:

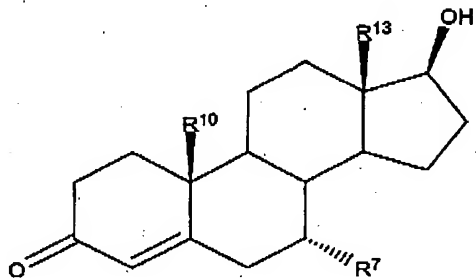
1. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 7 α -substituierten 11 α -
 5 Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel **4,B**:

**4,B**

worin

- 10 **R⁷** die Gruppierung P-Q ist, wobei
 P ein C₁- bis C₄-Alkylen und Q ein C₁- bis C₄-Alkyl- oder C₁- bis
 C₄-Fluoralkyl darstellt und die Gruppierung P-Q über P an das
 Steroidgrundgerüst gebunden ist,
R¹⁰ α - oder β -ständig sein kann und für H, CH₃ oder CF₃ steht, und
 15 **R¹³** Methyl oder Ethyl ist,

bei dem ein 7 α -substituiertes Steroid mit der allgemeinen Formel **3,A**:

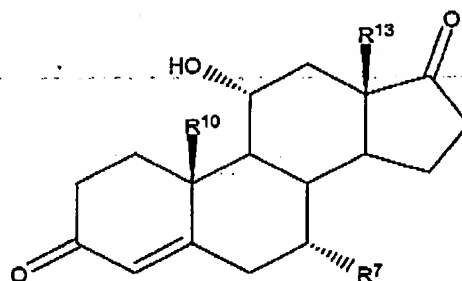
**3,A**

worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie zuvor angegeben,

- unter Verwendung eines Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Glomerella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Haplosporella sp.* und *Rhizopus sp.*, hydroxyliert und oxidiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus malignus*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Glomerella cingulata*, *Gnomonia cingulata*, *Haplosporella hesperedica* und *Rhizopus stolonifer*.

3. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 7α -substituierten 11α -Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel **4,B**:



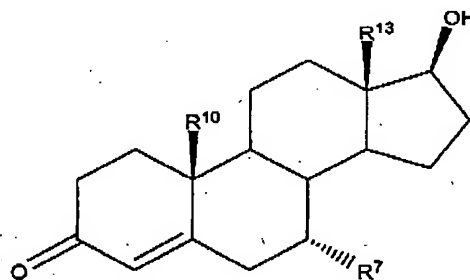
4,B

worin

- R^7 die Gruppierung P-Q ist, wobei
P ein C_1 - bis C_4 -Alkylen und Q ein C_1 - bis C_4 -Alkyl- oder C_1 - bis C_4 -Fluoralkyl darstellt und die Gruppierung P-Q über P an das Steroidgrundgerüst gebunden ist,
 R^{10} α - oder β -ständig sein kann und für H, CH_3 oder CF_3 steht, und
 R^{13} Methyl oder Ethyl ist,

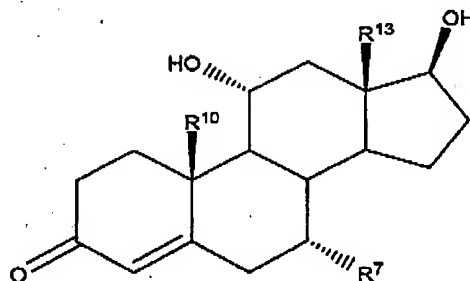
36

bei dem ein 7α -substituiertes Steroid mit der allgemeinen Formel **3,A**:

**3,A**

5 worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie zuvor angegeben,

in einem ersten mikrobiologischen Verfahrensschritt unter Verwendung eines ersten Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Gibberella sp.*, *Glomerella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Metarrhizium sp.*, *Nigrospora sp.*, *Rhizopus sp.* und *Verticillium sp.*, in 11 α -Stellung hydroxyliert wird unter Bildung eines 7α -substituierten 11 α -Hydroxysteroids mit der allgemeinen Formel **C**:

**C**

15 worin R^7 , R^{10} und R^{13} dieselben Bedeutungen haben wie zuvor angegeben, und

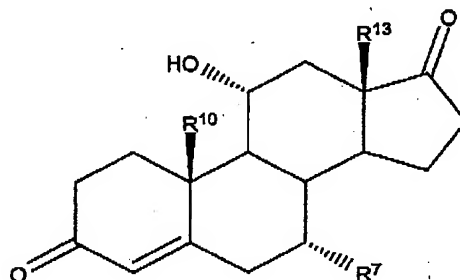
das entstandene 7α -substituierte 11 α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **C** dann in einem zweiten mikrobiologischen Verfahrensschritt unter Verwendung eines zweiten Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfas-

send *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp. und *Pseudomonas* sp., unter Bildung des 7 α -substituierten Steroids mit der allgemeinen Formel **4,B** oxidiert wird.

- 5 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Mikroorganismus ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus malignus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Beauveria bassiana*, *Gibberella fujikuroi*, *Gibberella zeae*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella fusaroides*, *Gnomonia cingulata*, *Metarrhizium anisopliae*, *Nigrospora sphaerica*,
10 *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* und *Verticillium dahliae*.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Mikroorganismus ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus sphaericus*, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia corallina*, *Nocardia globerula*, *Nocardia minima*, *Nocardia restrictus*, *Nocardia rubropertincta*, *Nocardia salmonicolor* und *Pseudomonas testosteroni*.
15

6. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 7 α -substituierten 11 α -
20 Hydroxysteroiden mit der allgemeinen Formel **4,B**:



4,B

worin

- 25 R^7 die Gruppierung P-Q ist, wobei

38

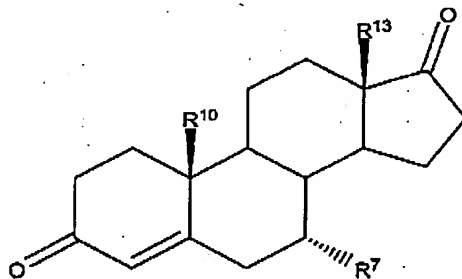
P ein C₁- bis C₄-Alkylen und Q ein C₁- bis C₄-Alkyl- oder C₁- bis C₄-Fluoralkyl darstellt und die Gruppierung P-Q über P an das Steroidgrundgerüst gebunden ist,

R¹⁰ für H, CH₃ oder CF₃ steht, und

5

R¹³ Methyl oder Ethyl ist,

bei dem 7 α -substituierte Steroide mit der allgemeinen Formel **D**:

**D**

10 worin **R⁷**, **R¹⁰** und **R¹³** dieselben Bedeutungen haben wie zuvor angegeben,

unter Verwendung eines Mikroorganismus, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend, *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Curvularia sp.*, *Gibberella sp.*, *Glomerella sp.*, *Gnomonia sp.*, *Haplosporella sp.*, *Helicostylum sp.*, *Nigrospora sp.*, *Rhizopus sp.* und *Syncephalastrum sp.*, hydroxyliert werden.

15

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus malignus*, *Aspergillus mel-leus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus variegatus*, *Beauveria bassiana*, *Curvularia lunata*, *Gibberella zeae*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella fusaroides*, *Gnomonia cingulata*, *Haplosporella hesperedica*, *Helicostylum piriformae*, *Nigrospora sphaerica*, *Rhizopus oryzae* und *Syncephalastrum racemosum*.

20

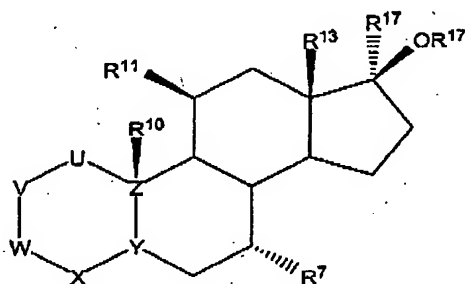
25

8. Mikrobiologisches Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^7 für CH_3 steht.

5 9. Mikrobiologisches Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^{10} für H steht.

10. Mikrobiologisches Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^{13} für CH_3 steht.

10 11. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidoide mit der allgemeinen Formel **8,10,12**:



8,10,12

worin

15 U-V-W-X-Y-Z für eine der Ringstrukturen $C^1-C^2-C^3-C^4=C^5-C^{10}$, $C^1-C^2-C^3-C^4-C^5=C^{10}$ oder $C^1-C^2-C^3-C^4-C^5-C^{10}$ steht, wobei in diesem Fall eine Oxogruppe ($=O$) an W ($=C^3$) gebunden ist, oder für die Ringstruktur $C^1=C^2-C^3=C^4-C^5=C^6$, wobei in diesem Falle der Rest OR^3 an W ($=C^3$) gebunden ist,

20 R^3 für H, C_1 - bis C_4 -Alkyl, C_1 - bis C_4 -Alkanoyl oder einen cyclischen C_3 - bis C_7 -Ether mit dem O-Atom des OR^3 -Rests steht,

R^7 die Gruppierung P-Q ist, wobei

P ein C_1 - bis C_4 -Alkyl und Q ein C_1 - bis C_4 -Alkyl- oder C_1 - bis C_4 -Fluoralkyl darstellt und die Gruppierung P-Q über P an das

25 Steroidgrundgerüst gebunden ist,

R^{10} α - oder β -ständig sein kann und für H, CH_3 oder CF_3 steht und nur dann vorhanden ist, wenn X-Y-Z nicht $C^4-C^5=C^{10}$ ist,

R^{11} ein Halogen ist,

R^{13} Methyl oder Ethyl ist,

5 R^{17} für H, C_1 - bis C_{18} -Alkyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkyl, C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, C_1 - bis C_{18} -Alkynyl, C_1 - bis C_{18} -Alkylaryl, C_1 - bis C_8 -Alkylennitril oder für die Gruppierung P-Q steht, wobei die Gruppierung P-Q die vorgenannte Bedeutung hat,

10 $R^{17'}$ für H, C_1 - bis C_{18} -Alkyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkyl, C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, alicyclisches C_1 - bis C_{18} -Alkenyl, C_1 - bis C_{18} -Alkynyl oder C_1 - bis C_{18} -Alkylaryl steht, wobei $R^{17'}$ auch über eine Ketogruppe an die 17β -Oxygruppe gebunden sein kann, und wobei $R^{17'}$ auch zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen $NR^{18}R^{19}$ oder einer oder mehreren Gruppen SO_xR^{20} substituiert sein kann, wobei $x = 0, 1$ oder 2 und R^{18} , R^{19} und R^{20}
15 jeweils unabhängig voneinander dieselbe Bedeutung wie R^{17} haben können.

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze, Ester und Amide.

20 12. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidenach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur $C^1-C^2-C^3-C^4=C^5-C^{10}$ oder $C^1-C^2-C^3-C^4-C^5=C^{10}$ oder $C^1=C^2-C^3=C^4-C^5=C^{10}$ steht.

25 13. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidenach einem der Ansprüche 11 und 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^1 für H steht.

14. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidenach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^7 für CH_3 steht.

30 15. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidenach einem der Ansprüche 11 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^{11} für Fluor steht.

16. $7\alpha, 17\alpha$ -substituierte 11β -Halogensteroidenach einem der Ansprüche 11 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß R^{13} für CH_3 steht.

17. 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroido nach einem der Ansprüche 11 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß R¹⁷ für H, CH₃, C₁- bis C₁₈-Alkynyl, CH₂CN oder CF₃ steht.

5

18. 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroido nach einem der Ansprüche 11 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß R¹⁷ Ethinyl ist.

19. 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroido nach einem der Ansprüche 11 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß R¹⁷ für H steht.

10

20. 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroido nach einem der Ansprüche 11 bis 19, nämlich

15

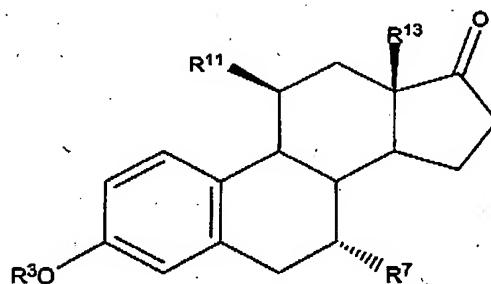
17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-4-en-3-on

17 α -Ethinyl-11 β -fluor-17 β -hydroxy-7 α -methylestr-5(10)-en-3-on

17 α -Ethinyl-11 β -fluor-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol.

21. 7 α -substituierte 11 β -Halogenestra-1,3,5(10)-triene mit der allgemeinen

20 Formel 6:



6

worin

25

R³ für H, C₁- bis C₄-Alkyl, C₁- bis C₄-Alkanoyl oder einen cyclischen C₃- bis C₇-Ether mit dem O-Atom des OR³-Rests steht,
R⁷ die Gruppierung P-Q ist, wobei

P ein C₁- bis C₄-Alkylen und Q ein C₁- bis C₄-Alkyl- oder C₁- bis C₄-Fluoralkyl darstellt und die Gruppierung P-Q über P an das Steroidgrundgerüst gebunden ist,

R¹¹ ein Halogen ist,

5 R¹³ Methyl oder Ethyl ist.

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Additionssalze, Ester und Amide.

10 22. 7 α -substituierte 11 β -Halogenestra-1,3,5(10)-triene nach Anspruch 21, nämlich

11 β -Fluor-3-hydroxy-7 α -methylestra-1,3,5(10)-trien-17-on.

15 23. Verfahren zur Herstellung von 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **10** nach einem der Ansprüche 11 bis 20, in denen U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur C¹-C²-C³-C⁴=C⁵-C¹⁰ steht, mit folgenden Verfahrensschritten:

- 20
- Nukleophile Substitution in einem 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** in 11-Stellung mit einem Halodehydroxylierungsreagens;
 - Umsetzen des dabei entstandenen 7 α -substituierten 11 β -Halogensteroids mit einem Alkylierungsmittel selektiv am C¹⁷-Atom des Ringgerüsts zu dem 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen
- 25 Formel **10**.

30 24. Verfahren zur Herstellung von 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **12** nach einem der Ansprüche 11 bis 20, in denen U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur C¹-C²-C³-C⁴-C⁵=C¹⁰ steht, mit folgenden Verfahrensschritten:

- Nukleophile Substitution in einem 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** in 11-Stellung mit einem Halodehydroxylierungsreagens,
- Umsetzen des dabei entstandenen 7 α -substituierten 11 β -Halogensteroids mit einem Alkylierungsmittel selektiv am C¹⁷-Atom des Ringgerüsts zu dem 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **10**,
- Isomerisieren des 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroids mit der allgemeinen Formel **10** zu dem entsprechenden Isomer mit der allgemeinen Formel **12**, bei dem U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur C¹-C²-C³-C⁴-C⁵=C¹⁰ steht.

25. Verfahren zur Herstellung von 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **8** nach einem der Ansprüche 11 bis 20, in denen U-V-W-X-Y-Z für die Ringstruktur C¹=C²-C³=C⁴-C⁵=C⁶ steht, mit folgenden Verfahrensschritten:

- Nukleophile Substitution in einem 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroid mit der allgemeinen Formel **4,B** in 11-Stellung mit einem Halodehydroxylierungsreagens,
- Oxidieren des dabei entstandenen 7 α -substituierten 11 β -Halogensteroids zum 7 α -substituierten Estra-1,3,5(10)-trien mit der allgemeinen Formel **6** nach einem der Ansprüche 17 und 18;
- Umsetzen des 7 α -substituierten Estra-1,3,5(10)-triens mit der allgemeinen Formel **6** mit einem Alkylierungsmittel selektiv am C¹⁷-Atom des Ringgerüsts zu dem 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **8**.

26. Verwendung der 7 α ,17 α -substituierten 11 β -Halogensteroiden mit der allgemeinen Formel **8,10,12** nach einem der Ansprüche 11 bis 20 zur Herstellung von Arzneimitteln.

27. Pharmazeutische Präparate, enthaltend mindestens ein 7 α ,17 α -substituiertes 11 β -Halogensteroid mit der allgemeinen Formel **8,10,12** nach einem der

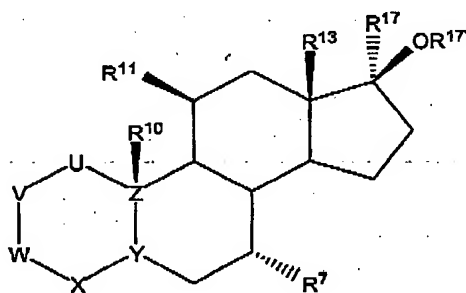
48

Ansprüche 11 bis 20 sowie mindestens einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

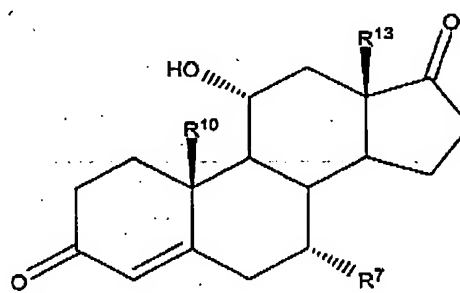
Mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von 7 α -substituierten 11 α -Hydroxysteroiden, daraus herstellbare 7 α ,17 α -substituierte 11 β -Halogensteroiden, deren Herstellungsverfahren und Verwendung sowie pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen enthalten, sowie daraus herstellbare 7 α -substituierte Estra-1,3,5(10)-triene

Zusammenfassung:

Es wird ein neuartiger Syntheseweg für die Herstellung von Vorprodukten für die Herstellung von Verbindungen mit der allgemeinen Formel **8,10,12** beschrieben. Bei dieser Synthese entstehen in einer mikrobiologischen Umsetzung Verbindungen mit der allgemeinen Formel **4,B**. Die Bedeutungen der Reste **R⁷**, **R¹⁰**, **R¹¹**, **R¹³**, **R¹⁷** und **R^{17'}** sowie der Gruppierung U-V-W-X-Y-Z sind in den Patentansprüchen angegeben.



8,10,12



4,B

15